

网络出版时间: 2023-12-28 11:17:03 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0752.001>

◇基础医学研究◇

## LMO4 在小鼠胚胎干细胞分化为血管内皮细胞和血管生成中的作用

项明华<sup>1</sup>, 涂珍珍<sup>2</sup>, 王月<sup>3</sup>, 周海胜<sup>4</sup>

**摘要** 目的 探讨转录因子 LIM 结构域蛋白 4 (LMO4) 在小鼠胚胎干细胞 (mESC) 分化为血管内皮细胞及新生血管中的作用。方法 使用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法从小鼠红系白血病细胞系 MEL 中克隆小鼠 *Lmo4* 的 cDNA, 并亚克隆到含有小鼠胎肝激酶-1 (*Flk-1*) 启动子驱动表达 *Gfp* 的载体 (pFG), 构建成血管细胞特异性表达的 LMO4 的载体 pFLG。将表达载体转染 mESC, 通过遗传霉素 (G418) 筛选, 获得 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 的细胞株; 将这些 mESC 在体外进行自我分化, 以形成 4 d 和 10 d 的胚胎体 (EB), 并进行成血管细胞的集落细胞形成实验 (BL-CFC); 以 10 d-EB 进行新生血管出芽实验, 观察和分析出芽长短、数目; 运用蛋白免疫印迹 (Western blot) 或定量 RT-PCR 方法对目的基因的表达进行检测。结果 PCR 结果证实成功构建了成血管细胞特异性表达的 LMO4 的表达载体 pFLG。通过 G418 筛选获得 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 的细胞株。这些 mESC 通过自我分化形成 4 d-EB 和 10 d-EB, 荧光显微镜下观察到 EB 内均可见绿色荧光标记的细胞。Western blot 检测显示: 与 mESC 相比, 4 d-EB 和 10 d-EB 的 LMO4 的表达显著增加。过量表达 LMO4 的 mESC/pFLG 产生 BL-CFC 效率为 (7.70% ± 1.27%), 而 mESC/pFG 细胞产生 BL-CFC 效率为 (1.15% ± 0.48%), 二者差异有统计学意义 ( $P = 0.021$ )。定量 RT-PCR 结果显示, *Flk-1*、*C-kit*、*Tie-2*、*Ve-cad* 基因在 10 d-EB/pFLG 中的表达, 均较 10 d-EB/pFG 中表达增加 2 倍以上。新生血管出芽实验结果显示, 10 d-EB/pFLG 的新生血管数量和长度均较 10 d-EB/pFG 增加 ( $P < 0.05$ )。结论 过量表达 LMO4 促进 mESC 形成成血管细胞, 并有利于血管内皮细胞的分化和血管的新生。

**关键词** 小鼠胚胎干细胞; 胚胎体; 成血管细胞; 血管内皮细胞; 新生血管

中图分类号 R 331.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0001-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.001

胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 是一种具有自我增殖、保持其分化全能性的一类干细胞。在胚胎发育过程中, 血管生成和造血发生均依赖于中胚层细胞分化, 进而可以分化为成血管细胞, 其标记分子是胎肝激酶-1 (fetal liver kinase-1, FLK-1)<sup>[1]</sup>。成血管细胞可以分化为造血细胞和血管内皮细胞 (endothelial cells, EC), 促进血管的生成。

LIM 结构域蛋白 (LIM domain protein, LMO) 具有两个串联重复排列的 LIM 结构域, 作为核内转录因子可以募集包括 LIM 结构域结合蛋白 1 (LIM domain binding protein 1, LDB-1) 在内的多种转录因子, 形成复合物启动靶基因转录<sup>[2-3]</sup>。LMO4 和 LMO2 是 LMO 蛋白的主要家族成员, 其中 LMO2 主要功能是促进红系的造血细胞分化<sup>[4-5]</sup>, 而 LMO4 和 LMO2 在组成上具有较高的同源性, 二者形成复合体调控中胚层细胞的分化和增殖<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>表明, 结扎颈总动脉后 LMO4 在血管 EC 中表达显著升高。而 LMO4 在成血管细胞的 EC 分化及血管生成中作用不清楚。该研究拟利用小鼠 ESC (mouse ESC, mESC) 体外诱导分化产生 EC 及新生血管的细胞模型, 探讨 LMO4 调控 mESC 向血管 EC 分化及其在血管生成中作用。

### 1 材料与方法

**1.1 细胞系与载体** 人上皮细胞系 ECV-304、小鼠红系白血病细胞系 MEL、中国仓鼠卵巢癌细胞系 CHO、人肝癌细胞系 HepG2、人胚胎肾上皮细胞系 293T、小鼠胚胎成纤维细胞系 MEF 和小鼠胚胎干细胞系 mESC-R1 (第 30~36 代) 等均由生物化学教研室保存。小鼠 *Flk-1* 基因启动子驱动绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, *Gfp*) 在小鼠成血管细

2023-10-29 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目 (编号: KJ2019A0946); 医学分子生物学国家重点实验室开放课题 (编号: 2060204)

作者单位: 安徽医科大学<sup>1</sup> 生物医学工程学院应用物理学系、<sup>4</sup> 基础医学院生物化学教研室, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院临床免疫研究所, 合肥 230022

<sup>3</sup> 安徽医科大学临床医学院生化教研室, 合肥 230031

作者简介: 项明华, 女, 实验师;

王月, 女, 助教, 责任作者, E-mail: zxsywy@163.com;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

胞特异性表达的载体( promoter of *Flk-1* driving *Gfp* expression , pFG) ,由本实验室在前期构建<sup>[8]</sup>。

**1.2 主要试剂** 单硫甘油( monothioglycerol , MTG) 、明胶、β-巯基乙醇和胰岛素转铁蛋白硒补充剂( insulin transferrin selenium supplement , ITS) 等均购自美国 Sigma 公司; 兔尾 I 型胶原是美国 B&D 生物科学公司产品; 甲基纤维素培养基 Methocult ® H4100 和改良的 IMDM 培养基均购自加拿大 Stem Cell Technologies 公司; 高糖 DMEM 培养基、胎牛血清( fetal bovine serum , FBS) 、非必需氨基酸和 L-谷氨酰胺( Glutamine , Gln) 购自美国 Gibco 公司; 血管内皮生长因子( vascular endothelial growth factor , VEGF) 和白细胞介素 6 购自美国 Pepro Tech 公司; IMDM 培养基、青链霉素购自美国 Hyclone 公司; 抗小鼠 LMO4 抗体购自美国 Santa Cruz 生物公司; 限制性核酸内切酶、DNA 连接酶、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 逆转录聚合酶链反应( reverse transcription-polymerase chain reaction , RT-PCR) 试剂盒购自宝生物工程( 大连) 有限公司。引物均由上海生工有限公司合成。见表 1。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 基因克隆和载体构建** 利用 TRIzol 试剂提取 MEL 细胞的总 RNA ( 1 μg) ,通过 RT-PCR 扩增小鼠 *Lmo4* 的 cDNA ,回收 PCR 产物 ,连接到 pGEM T-Easy 构建重组载体。利用 Apa I + Not I 对重组载体进行酶切; 回收目的 DNA 片段 *Lmo4* / ( Apa I + Not I) ,与 pFG / ( Apa I + Not I) 载体连接 ,构建 *Flk-1* 的顺式作用元件调控 *Lmo4* 表达的真核表达载体 ,并

经过测序验证小鼠 *Lmo4* 的 cDNA 序列 ,获得 *Flk-1* 启动子驱动 *Lmo4* 和 *Gfp* 融合表达载体( promoter of *Flk-1* driving *Lmo4* and *Gfp* expression , pFLG) 。

**1.3.2 mESC 培养和转染** 采用 ECV-304 细胞作为滋养层细胞进行 mESC 的培养<sup>[5,9]</sup>。配制 ECV-304 细胞的培养基包括高糖 DMEM、15% FBS、 $3 \times 10^{-4}$  mol/L MTG 和青链霉素混合液( penicillin/streptomycin , PS) 。将 0.1% 明胶加入细胞培养皿 ,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内过夜。次日接种 ECV304 细胞作为滋养层细胞备用 ,接种密度为  $7.5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup>。将复苏的 mESC 添加 ECV-304 细胞培养基重悬 ,直接接种到 ECV-304 饲养层细胞上 ,每日换液。培养 2 ~ 4 d ,可见单个 mESC 克隆形成。将培养的 ECV-304 滋养层细胞和 mESC 克隆按常规方法消化 ,按照 1 : 3 比例将 2 种细胞接种到用 0.1% 明胶预处理的培养皿中继续培养。

胰酶消化混合培养的 ECV-304 和 mESC ,差异贴壁法分离 mESC 并制备单细胞悬液。将  $0.8 \times 10^7$  个细胞与 25 μg 质粒 DNA( pFG 或 pFLG) 混合后进行电转。电转的电压为 230 ~ 250 V ,电容是 500 μF。将电转后 mESC 转移到预处理平皿 ,培养 24 h 后加入遗传霉素( Geneticin , G418) ( 200 mg/L) 筛选培养 8 ~ 10 d ,每日更换 1 次培养液。获得的细胞克隆分别命名为 mESC/pFG 和 mESC/pFLG。

**1.3.3 胚胎体( embryoid bodies , EB) 形成和集落克隆形成细胞( blast-colony forming cell , BL-CFC) 实验** 配制分化 EB 的培养基: IMDM 培养基、15% FBS、 $3 \times 10^{-4}$  mol/L MTG、0.5% ITS、50 ng/ml 维生

表 1 引物列表

基因名称	基因号	引物 (5'-3')	PCR 产物( bp)	目的
<i>Lmo4</i>	NM_010723.3	F: ATGGTGAATCCGGGCAGCAGCT	495	克隆 cDNA
		R: GCAGACCTTCTGGTCTGGCAG		
		F: AGTGAAGCCACATTGCCAAAC	154	定量 RT-PCR
		R: CCCGGCGAAGAAGTGTC AAG		
<i>Flk-1</i>	NM_001363216.1	F: CATTGCCTGGTCAAACAGCTC	107	定量 RT-PCR
		R: GTGCCAGCCTACTACAACACT		
<i>Tie-2</i>	NM_001290549.1	F: GCTCAGGCATTCCAGAACAGA	152	定量 RT-PCR
		R: CCCTCTCCGATCAGCTCTTG		
<i>C-kit</i>	NM_001122733.1	F: ATAGACTCCAGCGTCTTCCG	121	定量 RT-PCR
		R: CCTGGATTGCTCTTTGTTGTT		
<i>Cd-41</i>	NM_010575.2	F: CTGTTCAACGCTCTCCTCCC	110	定量 RT-PCR
		R: GAATGGCCCTCTCCTCCAAG		
<i>Ve-cad</i>	NM_009868.4	F: CTCCTCCTGAGGCAATCA	100	定量 RT-PCR
		R: GGAGGAGCTGATCTTGTCGG		
<i>β-actin</i>	NM_007393.5	F: GTTGGAGCAAACATCCCCCA	187	定量 RT-PCR
		R: ACGCGACCATCCTCCTCTTA		

素 C、2  $\mu\text{mol/L}$  Gln 和 PS。调整 mESC 浓度为 3 000 个/ml,接种在低附着力的  $\phi$  6 cm 平皿中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内悬浮培养,每 8~12 h 摇动平皿以防细胞贴壁。每隔 1~2 d 半量换液,直到 EB 形成。

配制 BL-CFC 的分化培养基:IMDM 培养基、1% Methocult<sup>®</sup> H4100、2  $\mu\text{mol/L}$  Gln、 $3 \times 10^{-4}$  mol/L MTS、25 ng/ml 维生素 C、1 mmol/L ITS、5 ng/ml VEGF、10 ng/ml 白细胞介素 6、15% FBS 和 PS。收集 4 d EB,胰酶消化制备单细胞悬液,用不含甲基纤维素的 BL-CFC 分化培养基重悬细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml,与含甲基纤维素的 BL-CFC 半固体分化培养基以 1:1 体积比混合。按照  $2 \times 10^4$  个/孔将细胞接种于 24 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱内培养 2~4.5 d。显微镜下观察集落细胞的形成情况,并计算集落数量。根据接种细胞数计算集落形成效率,每组设计 3 个平行实验。

#### 1.3.4 mESC 分化为血管 EC 和新生血管出芽实验

配制血管 EC 分化培养基:1.25 mg/ml 兔尾 I 型胶原、15% FBS、 $4.5 \times 10^{-4}$  mol/L MTG、1 mmol/L ITS 和 PS,放置冰上备用。收集第 10 天的 EB,用上述分化培养基调整 EB 细胞浓度。按 50 个 EB/孔接种至 6 孔板中,每组设置 3 个平行试验,在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的饱和湿度培养箱内培养 10~12 d,完成新生血管出芽实验。镜下观察血管 EC 分化及血管生成情况。根据出芽数量及出芽长短,从接种 50 个 EB 中分组计算比例并进行统计分析。较长的发芽或发芽数  $\geq 5$  为 I 组;较短发芽或发芽数  $< 5$  为 II 组,没有发芽的为 III 组。

1.3.5 基因表达分析 根据参考文献<sup>[5]</sup>,采用实时定量 RT-PCR 分析和蛋白质免疫印迹(Western blot)等方法,检测目的基因的表达。根据 TRIzol 试剂说明书提取细胞总 RNA,并参照试剂盒说明进行逆转录后进行 PCR。PCR 反应条件设置为 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s,共 32 个循环,循环结束后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。与  $\beta$ -actin 内参基因进行相对定量分析后,再与对照组比较计算倍数关系。Western blot 分析蛋白表达时,收集细胞的总蛋白,100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,使蛋白发生变性;进行 12% 聚丙烯酰胺-SDS 电泳分离蛋白质;再以 170 mA 稳定电流转膜 1.5 h;含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭 40 min;分别加入对应的抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;次日漂洗后加入酶标记二抗室温孵育 6 h,增强化学发光曝光显影。

#### 1.3.6 免疫组织化学 脱蜡处理组织切片 枸橼酸

盐修复抗原,内源性过氧化物酶进行封闭。兔源抗体 LMO4 在 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;次日依次滴加反应增强液和增强型酶标记二抗,室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木精染细胞核,自来水冲洗多余的染料,烘干后使用中性树脂封片,置于显微镜下观察和拍照。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 11.0 统计软件,组间比较采用 2 个独立样本均数的  $t$  检验,实验数据以均数  $\pm$  标准差表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 成血管细胞特异性表达 Lmo4 的载体验证结果 RT-PCR 检测细胞中 Lmo4 表达。结果显示:Lmo4 在 MEL 和 MEF 细胞中有较高水平的表达,在其他细胞中均未检测到表达。见图 1A。

根据 pFG 表达载体的结构(图 1B),拟在 Hind III 酶切点插入 Lmo4 cDNA,构建成血管细胞特异性过量表达 LMO4 的载体 pFLG。以 MEL 细胞的总 RNA 为模板,利用 RT-PCR 获得的 Lmo4 cDNA(495 bp),克隆到 pMD-18T 载体;Hind III 酶切、回收 Lmo4 cDNA。同时在 pFG 载体的 Hind III 酶切位点将 Lmo4 的 cDNA 插入 Gfp 的表达框上游,以构建 Lmo4-Gfp 融合表达载体 pFLG。随机挑起 4 个菌落作为 PCR 模板,对细菌克隆进行 PCR 验证。结果显示:1 号和 2 号克隆中成功插入了 Lmo4 的 cDNA;同时 PCR 检测该克隆中含有 Flk-1 基因的启动子(Flk-1/P)和增强子(Flk-1/E)(图 1C)。将 1 号克隆的质粒 DNA 进行测序分析,结果显示 Lmo4 cDNA 序列正确,且其开放阅读框架内序列无突变(图 1D)。由此成功获得了成血管细胞特异性表达 LMO4-GFP 的表达载体 pFLG。

#### 2.2 mESC 自发分化形成 EB 伴随 LMO4 的表达

mESC/pFG 和 mESC/pFLG 在 EB 分化培养基中发生自发分化,从第 2 天开始可见 EB 产生。图 2A 显示 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 在 4 d 和 10 d 分别形成典型的 EB/pFG 和 EB/pFLG;荧光显微镜下观察这些 EB 细胞,结果显示:4 d-EB/pFG、10 d-EB/pFG、4 d-EB/pFLG 和 10 d-EB/pFLG 中均可见绿色荧光细胞(图 2A),提示自发分化的 EB 中含有成血管细胞。

分别收集 4 d-EB 和 10 d-EB,提取蛋白进行 Western blot 检测。结果显示,EB/pFG 和 EB/pFLG 均有 LMO4 表达,且 10 d-EB/pFG 中内源性表达的 LMO4 较 4 d-EB/pFG 显著增高;在 4 d-和 10 d-EB/pFLG 因含有成血管细胞,故可见有 LMO4 明显表

达;但在 mESC 中未检测到 LMO4 表达(图 2B)。

**2.3 LMO4 过量表达对 mESC 分化为成血管细胞的影响** 利用 BL-CFC 来分析 LMO4 的表达对 mESC 分化为成血管细胞的影响。自分化的 4d-EB 在 BL-CFC 的分化培养基中培养 8 d 后,可见集落细胞形成(图 3A);用荧光显微镜观察,结果显示来源于 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 的集落细胞均可见绿色荧光。来源于 mESC/pFG 细胞产生 BL-CFC/pFG 的效率为(1.15% ± 0.48%);来源于 mESC/pFLG 细胞所形成 BL-CFC/pFLG 的效率为(7.70% ± 1.27%)。进一步进行对比分析显示,BL-CFC/pFLG 相较于 BL-CFC/pFG 的集落形成率增加,差异有统计学意义( $P=0.021$ ) (图 3B)。

**2.4 LMO4 过量表达对 mESC 分化 EC 及新生血管的影响** 利用实时定量 RT-PCR 检测 mESC 自发分化形成的 EB 中目的基因表达。结果显示:与 4 d-EB/pFG 相比, *Lmo4* 及 EC 特异性表达的基因 *Flk-1*、*C-kit*、*Ve-cad*、*Cd-41* 和 *Tie-2* 等在 4 d-EB/pFLG 中的表达差异不明显;与 10 d-EB/pFG 相比, *Cd-41* 在 10 d-EB/pFLG 中的表达差异无统计学意义( $P =$

0.23);其他基因在 10 d-EB/pFLG 中的表达水平,均较 10 d-EB/pFG 细胞增加 2 倍以上(图 4A)。这些结果提示:10 d-EB 更有利于 mESC 向 EC 的分化;过量表达 LMO4 有利于促进 mESC 的 EC 分化过程。拟使用 10 d-EB 开展后续的新生血管实验。

选择自分化的 10 d-EB,按照每孔接种 50 个 EB,在血管 EC 分化培养基中继续培养到第 3~5 天,镜下显示在 EB 的周围可见血管样发芽(图 4B)。根据接种 EB 数及在新生血管出芽实验中出芽的长短和数量进行统计分析。结果显示(图 4C):与 10 d-EB/pFG 相比, I、II、III 组中 10 d-EB/pFLG 出芽较长和(或)出芽分支数多的比例明显增加,差异有统计学意义(I 组:  $t = -10.55, P = 0.009$ ; II 组:  $t = 6.38, P = 0.024$ ; III 组:  $t = 8.69, P = 0.013$ )。因此,过量表达 LMO4 有利于 mESC 分化为 EC,且促进新生血管的生成。

### 3 讨论

在胚胎发育过程中,发生早期造血和血管形成的血岛细胞主要是来自 7 d 胚胎的卵黄囊中胚层细

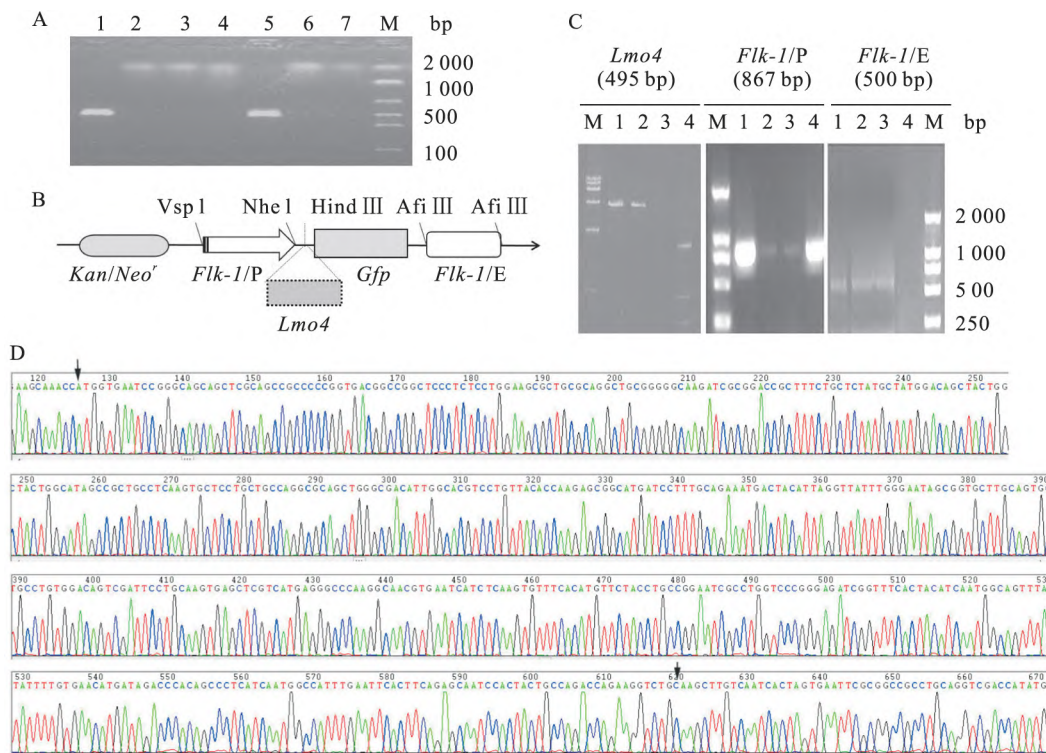


图 1 基因克隆、载体构建及其鉴定

A: RT-PCR 检测细胞中 LMO4 的表达;泳道 1~7: MEL、mESC、CHO、HepG2、MEF、293T 和阴性对照; M: DNA marker (DL 2 000); B: 成血管细胞特异性表达载体 pFG 和 pFLG 图谱; *Flk-1/P*: *Flk-1* 基因的启动子; *Flk-1/E*: *Flk-1* 基因的增强子; *Kan/Neo'*: 卡那霉素抗性基因和 G418 抗性基因; C: PCR 鉴定重组载体 pFLG 的组分; M: DNA marker (DL 2 000); 泳道 1~4: 1~4 号克隆; D: 小鼠 *Lmo4* 基因 cDNA 测序结果; 第 125 位的箭头: 起始密码子(ATG)的第一个碱基 A; 第 620 位的箭头: 最后一个密码子(TGC)的第三个碱基 C

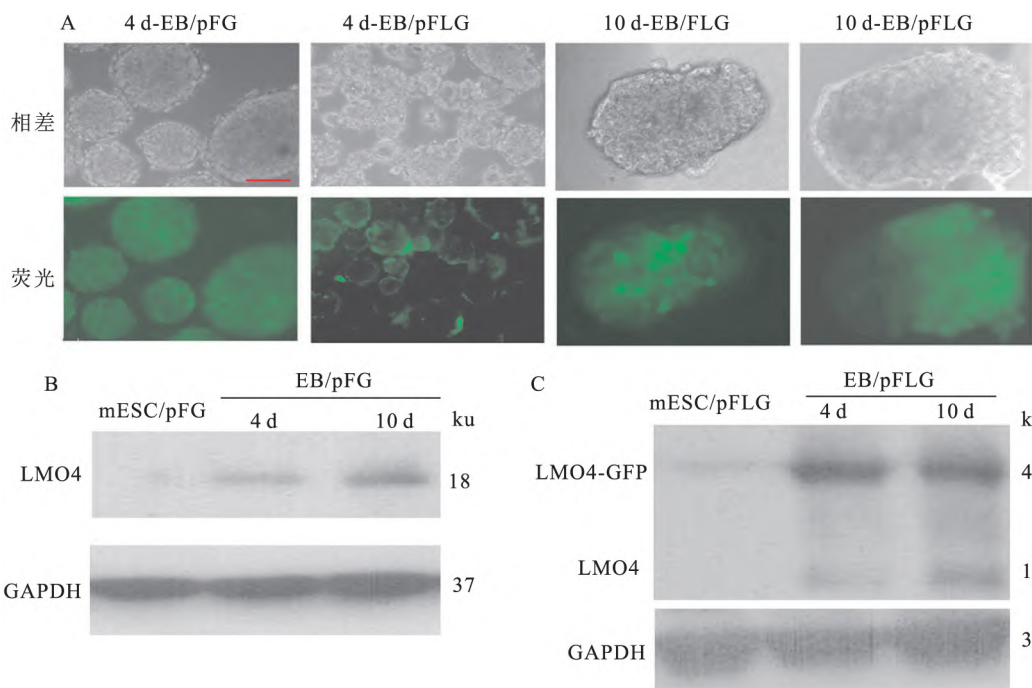


图2 自分化形成EB及LMO4的表达

A: 由 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 自发分化形成的 4 d-EB 和 10 d-EB; bar = 20 μm; B: Western blot 检测 mESC/pFG 及其分化的 EB 中 LMO4 的表达; C: Western blot 检测 mESC/pFLG 及其分化的 EB 中 LMO4 的表达; LMO4-GFP: LMO4 抗体检测的 LMO4 与 GFP 融合表达蛋白

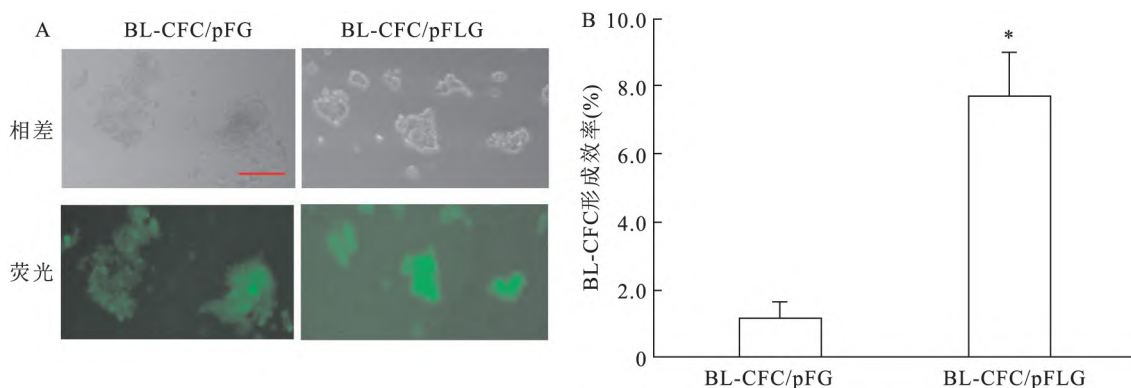


图3 BL-CFC分析LMO4的表达对成血管细胞分化的影响

A: 由 mESC/pFG 和 mESC/pFLG 分化形成的 BL-CFC/pFG 和 BL-CFC/pFLG; bar = 20 μm; B: BL-CFC 的形成效率; 与 BL-CFC/pFG 比较: \*  $P < 0.05$

胞,并由此可产生胚胎的造血细胞和血管 EC,进而形成早期血管样结构。因此,造血的发生与血管 EC 分化及血管生成存在时间和空间上一致性。体外实验也证实血管 EC 在发育和分化过程中主要来自具有多能性特点的成血管细胞<sup>[10]</sup>。由 mESC 体外诱导分化形成的 EB 时可以形成多能性的成血管细胞,FLK-1 是其特异性的标记分子<sup>[11]</sup>。这些细胞在特定分化条件下可以形成造血细胞和血管 EC 并伴随新生血管的形成。该研究中,利用 *Flk-1* 基因的调控元件驱动 *Gfp* 的表达,有利于对 mESC 分化的

成血管细胞进行特异性标记,为观察、分离和纯化成血管细胞提供了有效手段<sup>[11]</sup>。此外,利用该表达载体可以实现 LMO4 在成血管细胞特异性过量表达,为研究 LMO4 在调控成血管细胞分化过程中作用奠定了基础。

LMO4 作为转录因子,参与调控多种靶基因的表达。研究<sup>[12-13]</sup>表明,LMO4 对上皮组织(如肺、肾、皮肤、舌、小肠、子宫和乳腺)中的上皮细胞分化具有调控作用。研究<sup>[14]</sup>也证实在白血病、乳腺癌、消化系肿瘤、肺癌、头颈肿瘤、皮肤鳞癌和前列腺癌

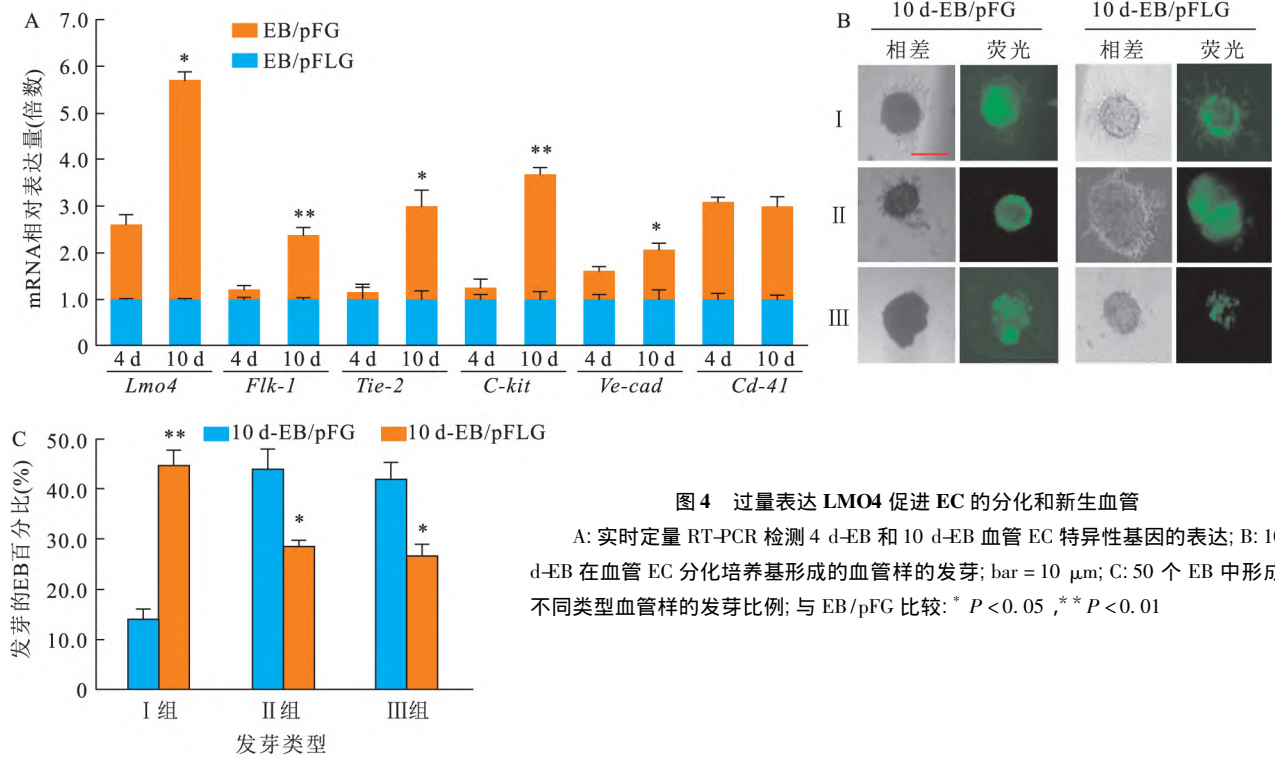


图4 过量表达 LMO4 促进 EC 的分化和新生血管

A: 实时定量 RT-PCR 检测 4 d-EB 和 10 d-EB 血管 EC 特异性基因的表达; B: 10 d-EB 在血管 EC 分化培养基形成的血管样的发芽; bar = 10 μm; C: 50 个 EB 中形成不同类型血管样的发芽比例; 与 EB/pFG 比较: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01

等多种肿瘤中 ,LMO4 的表达变化影响肿瘤细胞的增殖、凋亡和迁移等生物学行为。对于 LMO4 在血管内皮细胞分化及新生血管中的作用 ,鲜有报道。该研究结果显示: 由 mESC 自发分化而产生的成血管细胞中 ,过量表达 LMO4 能显著增加成血管细胞数量。与此同时 ,在成血管细胞中特异性过量表达 LMO4 情况下 ,Flk-1、Tie2、C-kit 等作为 EC 的特异性标记分子<sup>[15]</sup> ,其表达水平均显著增加; 而造血细胞特异性分子 Cd-41 的表达变化不明显 ,提示分化产生的 EC 细胞数量显著增加。其可能的机制是: 一方面 ,LMO4 过量表达有利于成血管细胞向 EC 的分化; 另一方面 ,过去的研究<sup>[9]</sup> 表明颈总动脉结扎后 ,在血管 EC 中增高 LMO4 表达的同时伴随 EC 的增殖 ,提示过量表达 LMO4 有利于 EC 细胞增殖。

早在 2006 年 Meier et al<sup>[3]</sup> 发现在胚胎发育晚期 LMO4 与 LDB-1 共同参与调控造血干细胞的增殖和分化 ,鉴于胚胎早期的造血发生与血管 EC 发生和血管生成在时间和空间上具有一致性 ,因此 ,LMO4 可能参与了早期的血管发生。在该研究中 ,mESC 自发分化形成 10 d-EB 后进行新生血管生成实验证实 ,LMO4 过量表达情况下 ,成血管细胞及内皮细胞参与的新生血管能力明显增加。通过改变 LMO4 的表达水平 ,促进血管内皮细胞增殖和血管形成在器官移植及血管修复中具有重要作用。但是新生血管除依赖血管内皮细胞外 ,还依赖包括血管外膜上皮

细胞、血管壁的成纤维细胞和平滑肌细胞等细胞的分化和增殖 ,而 LMO4 是否调控这些细胞的分化和增殖还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Aragon J W , Hirschi K K. Endothelial cell differentiation and hemogenic specification [J]. Cold Spring Harb Perspect Med , 2022 , 12( 7) : a041164.
- [2] Wadman I A , Osada H , Grütz G G , et al. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid , DNA-binding complex which includes the TAL1 , E47 , GATA-1 and Ldb1 / NLI proteins [J]. Embo J , 1997 , 16( 11) : 3145 - 57.
- [3] Meier N , Krpic S , Rodriguez P , et al. Novel binding partners of Ldb1 are required for haematopoietic development [J]. Development , 2006 , 133( 24) : 4913 - 23.
- [4] Terano T , Zhang Y , Toyokuni S , et al. Transcriptional control of fetal liver hematopoiesis: dominant negative effect of the overexpression of the LIM domain mutants of LMO2 [J]. Exp Hematol , 2005 , 33( 6) : 641 - 51.
- [5] 周海胜 李 春 , 查晓军 等. 过量表达 LMO2 促进成血管细胞的增殖和造血分化 [J]. 中国医学科学院学报 , 2013 , 35( 2) : 177 - 84.
- [6] Kuvardina O N , Herkt S , Meyer A , et al. Hematopoietic transcription factors and differential cofactor binding regulate PRKACB isoform expression [J]. Oncotarget , 2017 , 8( 42) : 71685 - 98.
- [7] Grosveld F , Rodriguez P , Meier N , et al. Discovery of novel mechanosensitive genes *in vivo* using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow [J]. Blood , 2010 , 116( 15) : e66 - 73.

- [8] 李春, 周诗君, 翟志敏, 等. 特异性标记胚胎干细胞分化过程中的成血管细胞[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(5): 545-8.
- [9] Zhou H, Yong J, Sun X, et al. A human endothelial cell feeder system that efficiently supports the undifferentiated growth of mouse embryonic stem cells[J]. *Differentiation*, 2008, 76(9): 923-30.
- [10] Zhou F, Li X, Wang W, et al. Tracing haematopoietic stem cell formation at single-cell resolution[J]. *Nature* 2016, 533(7604): 487-92.
- [11] Hidaka M, Stanford W L, Bernstein A. Conditional requirement for the Flk-1 receptor in the *in vitro* generation of early hematopoietic cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(13): 7370-5.
- [12] Hahm K, Sum E Y M, Fujiwara Y, et al. Defective neural tube closure and anteroposterior patterning in mice lacking the LIM protein LMO4 or its interacting partner Deaf-1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(5): 2074-82.
- [13] Holik A Z, Filby C E, Pasquet J, et al. The LIM-domain only protein 4 contributes to lung epithelial cell proliferation but is not essential for tumor progression[J]. *Respir Res*, 2015, 16(1): 67-82.
- [14] 李静怡, 申秀锦, 邓红. LMO4 调节肿瘤发生过程中的上皮间质转化[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(1): 107-11.
- [15] Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage[J]. *Nature* 2009, 457(7231): 892-5.

## The roles of LMO4 in endothelial cells differentiation and angiogenesis from murine embryonic stem cells

Xiang Minghua<sup>1</sup>, Tu Zhenzhen<sup>2</sup>, Wang Yue<sup>3</sup>, Zhou Haisheng<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Applied Physics, School of Biomedical Engineering, <sup>4</sup>Dept of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup>Institute of Clinical Immunology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; <sup>3</sup>Clinical College of Anhui Medical University, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To examine the role of LMO4 in the regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis in murine embryonic stem cells (mESC). **Methods** Mouse *Lmo4* cDNA was obtained from MEL cells by using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and subcloned into the expression vector pFG to generate the pFLG, in which contained *Flk-1* promoter to drive *Lmo4* expresses in only FLK-1+ cells. The mESC were transfected with pFG or pFLG plasmids and subsequently screened with geneticin (G418) to produce cell clones. These cell clones were named mESC/pFG and mESC/pFLG, respectively. The mESC/pFG and mESC/pFLG were cultured in the differentiation medium for either 4 days or 10 days to generate embryoid bodies (EB). The 10-day embryoid bodies (10 d-EBs) carrying the pFG and pFLG vectors were subsequently stimulated to generate the blast-colony forming cells (BL-CFC), which indicated the presence of hemangioblasts. The endothelial cell sprouting analysis was performed by using 10 d-EBs. The expression of the interest genes was detected by using qualitative RT-PCR or Western blot analysis. **Results** The pFLG expression vector was successfully constructed through PCR identification. The mESC/pFG and mESC/pFLG cells were obtained after transfected with the pFG or pFLG vectors and selected by G418. The cells spontaneously differentiate to generate EBs, in which some green fluoresce cells were present. Western blot analysis showed that a significant increase in LMO4 expression in both 4 d-EB and 10 d-EB when compared to mESC. BL-CFC analysis showed that the 4 d-EB/pFLG had a higher cloning efficiency ( $7.70\% \pm 1.27\%$ ), comparing with that of the 4 d-EB/pFG ( $1.15\% \pm 0.48\%$ ) ( $P = 0.021$ ). Quantitative RT-PCR results showed that the expression of *Flk-1*, *C-kit*, *Tie-2* and *Ve-cad* genes in 10 d-EBs/pFLG increased more than 2-fold compared to 10 d-EBs/pFG. The endothelial cell sprouting analysis result showed a significant increase in the number and length of new blood vessels in 10 d-EB/pFLG compared to 10 d-EB/pFG ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of LMO4 promotes hemangioblast differentiation from mESC, and benefits for endothelial cell differentiation and angiogenesis.

**Key words** mouse embryonic stem cell; embryoid body; hemangioblast; endothelial cell; angiogenesis